

* NOTICES *

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.*** shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1]

Water-soluble nonpeptidic low molecule drugs which carried out hydrophobing with metal ion are enclosed with a lactic acid-glycolic acid copolymer or a lactic acid polymer nano particle, A nano particle for intravenous injections aiming at targeting and gradual release consisting of having given a surface-active agent to the surface of the lactic acid-glycolic acid copolymer concerned or a lactic acid polymer nano particle.

[Claim 2]

The nano particle for intravenous injections according to claim 1, wherein a diameter of particles is 50-300 nm.

[Claim 3]

The nano particle for intravenous injections according to claim 1, wherein a molecular weight of water-soluble nonpeptidic low molecule drugs is 1000 or less.

[Claim 4]

The nano particle for intravenous injections according to claim 1, wherein metal ion is either zinc, iron, copper, nickel, beryllium, manganese or cobalt.

[Claim 5]

The nano particle for intravenous injections according to claim 1 having a phosphate group so that hydrophobing of the water-soluble nonpeptidic low molecule drugs may be easy to be carried out with said metal ion.

[Claim 6]

The nano particle for intravenous injections according to claim 1 having a carboxyl group so that hydrophobing of the water-soluble nonpeptidic low molecule drugs may be easy to be carried out with said metal ion.

[Claim 7]

The nano particle for intravenous injections according to claim 1, wherein water-soluble nonpeptidic low molecule drugs are a steroidal anti-inflammatory drug, a non-steroidal anti-inflammatory drug, prostanoids, an antimicrobial drug, or a anticancer drug.

[Claim 8]

The nano particle for intravenous injections according to claim 1, wherein a surface-active agent is polyoxyethylene polyoxypropylene glycols, polysorbates, polyoxyethylene octylphenyl ether, lecithin,

or polyvinyl alcohol.

[Claim 9]

Carry out hydrophobing of the water-soluble nonpeptidic low molecule drugs with metal ion, and a water soluble organic solvent is made to dissolve or suspend with a lactic acid-glycolic acid copolymer or a lactic acid polymer. A manufacturing method of a nano particle for intravenous injections aiming at targeting and gradual release giving a surface-active agent on the surface of a nano particle by adding in solution containing a surface-active agent.

[Claim 10]

A manufacturing method of the nano particle for intravenous injections according to claim 9, wherein a diameter of particles is 50-300 nm.

[Claim 11]

A manufacturing method of the nano particle for intravenous injections according to claim 9, wherein a molecular weight of water-soluble nonpeptidic low molecule drugs is 1000 or less.

[Claim 12]

A manufacturing method of the nano particle for intravenous injections according to claim 9, wherein metal ion is either zinc, iron, copper, nickel, beryllium, manganese or cobalt.

[Claim 13]

A manufacturing method of the nano particle for intravenous injections according to claim 9 having a phosphate group so that hydrophobing of the water-soluble nonpeptidic low molecule drugs may be easy to be carried out with said metal ion.

[Claim 14]

A manufacturing method of the nano particle for intravenous injections according to claim 9 having a carboxyl group so that hydrophobing of the water-soluble nonpeptidic low molecule drugs may be easy to be carried out with said metal ion.

[Claim 15]

A manufacturing method of the nano particle for intravenous injections according to claim 9, wherein water-soluble nonpeptidic low molecule drugs are a steroidal anti-inflammatory drug, a non-steroidal anti-inflammatory drug, prostanoids, an antimicrobial drug, or an anticancer drug.

[Claim 16]

A manufacturing method of the nano particle for intravenous injections according to claim 9, wherein a surface-active agent is polyoxyethylene polyoxypropylene glycols, polysorbates, polyoxyethylene octylphenyl ether, lecithin, or polyvinyl alcohol.

[Claim 17]

Anti-inflammation, an antirheumatic which contain a nano particle which enclosed water-soluble steroid as an active principle.

[Claim 18]

The anti-inflammation according to claim 17, an antirheumatic whose water-soluble steroid is phosphoric acid betamethasone.

[Translation done.]

* NOTICES *

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.*** shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

[Field of the Invention]

[0001]

This invention relates to a nano particle for intravenous injections which enclosed water-soluble nonpeptidic low molecule drugs aiming at targeting and gradual release, and a manufacturing method for the same. In detail, it is related with a nano particle for intravenous injections aiming at gradual release of targeting of the water-soluble nonpeptidic low molecule drugs to a lesion region, and the drug concerned in a lesion region, and a manufacturing method for the same.

[Background of the Invention]

[0002]

Until now, the micro particles thru/or nano particle of a lactic acid-glycolic acid copolymer (PLGA) or a lactic acid polymer (PLA) which enclosed water-soluble low molecule drugs has been developed and proposed by many researchers. For example, US,4,652,441,B has disclosed nano particles, such as PLGA which microcapsules, such as PLGA containing bioactive polypeptide, and the process of those are indicated, and contains various drugs in JP,H10-191957,A and in which intravascular administration is possible. JP,H8-217691,A has disclosed the sustained release drug which enclosed the water-insoluble nature or damage-at-sea solubility polyvalent metallic salt of the water-soluble peptide sex physiology active substance with microcapsules, such as PLGA.

[0003]

However, in these prior patents, after carrying out hydrophobing of the water-soluble nonpeptidic low molecule drugs with metal ion, about the nano particle for intravenous injections aiming at targeting and gradual release, neither reference nor suggestion is carried out at all by enclosing with a nano particle.

this invention person etc. have been performing patent application about the pharmaceutical preparation which consists of a nano particle of a lactic acid-glycolic acid copolymer (PLGA) or a lactic acid polymer (PLA) (application for patent 2002-159190). However, in the nano particle which this invention person etc. proposed, the enclosure rate into the nano particle of water-soluble low molecule drugs was low. Although the enclosure rate into the nano particle of the drugs concerned improves when the hydrophobicity of water-soluble low molecule drugs is improved by performing esterification etc., it cannot be said that the release period of the enclosed drug is short and sustained-release is enough.

Therefore, while being able to enclose water-soluble nonpeptidic low molecule drugs in particles, and controlling the initial burst phenomenon of the drugs concerned from particles and this invention's being able to release drugs gradually over a long period of time, It aims at providing the nano particle for intravenous injections in which targeting to a lesion region is possible.

This invention makes it SUBJECT to provide the simple method of preparation suitable for extensive preparation for drugs-inizing about the nano particle for these intravenous injections.

[0004]

In order to solve this SUBJECT, this invention persons paid their attention to the interaction of water-soluble nonpeptidic low molecule drugs and metal ion. That is, enclosure into the nano particle of PLGA or PLA was

considered by giving hydrophobicity by combining water-soluble nonpeptidic low molecule drugs with metal ion. As a result, the water-soluble nonpeptidic low molecule drugs which have hydrophobicity found out that it could enclose into the nano particle of PLGA or PLA very efficiently by combining with metal ion. Discharge of the drugs concerned from particles is gradual release-like, and from the accumulation nature to a lesion region being good, the obtained nano particle found out that it could become good targeting and gradual release pharmaceutical preparation, and completed this invention.

[Description of the Invention]

[Problem to be solved by the invention]

[0005]

Namely, the water-soluble nonpeptidic low molecule drugs which carried out hydrophobing of this invention with metal ion as the fundamental mode, It is a nano particle for intravenous injections aiming at targeting and the gradual release consisting of having enclosed with the lactic acid-glycolic acid copolymer (PLGA) or the lactic acid polymer (PLA) nano particle, and having given the surface-active agent to the surface of the PLGA concerned or a PLA nano particle.

[0006]

More concrete this invention is the above-mentioned nano particle for intravenous injections, wherein the diameter of PLGA or a PLA nano particle is 50-300 nm.

Still more concrete this invention is the above-mentioned nano particle for intravenous injections, wherein the molecular weight of the water-soluble nonpeptidic low molecule drugs enclosed with PLGA or a PLA nano particle is 1000 or less.

[0007]

Concrete this invention is the above-mentioned nano particle for intravenous injections, wherein the metal ion combined with water-soluble nonpeptidic low molecule drugs is either zinc, iron, copper, nickel, beryllium, manganese or cobalt.

This invention is the above-mentioned nano particle for intravenous injections specifically characterized by the water-soluble nonpeptidic low molecule drugs made to enclose with PLGA or a PLA nano particle having a phosphate group or a carboxyl group in intramolecular further again.

[0008]

More specifically, this invention is the above-mentioned nano particle for intravenous injections, wherein these water-soluble nonpeptidic low molecule drugs are a steroidal anti-inflammatory drug, a non-steroidal anti-inflammatory drug, prostanoids, an antimicrobial drug, or an anticancer drug.

The surface-active agent which more specifically covers the surface of PLGA which enclosed water-soluble nonpeptidic low molecule drugs, or a PLA nano particle further again this invention, It is the above-mentioned nano particle for intravenous injections being polyoxyethylene polyoxypropylene glycols, polysorbates, polyoxyethylene octylphenyl ether, lecithin, or polyvinyl alcohol.

[0009]

This invention is a manufacturing method of the nano particle for intravenous injections aiming at above-mentioned targeting and gradual release as another mode, and in detail, Carry out hydrophobing of the water-soluble nonpeptidic low molecule drugs with metal ion, and nonpeptidic low molecule drugs, A water soluble organic solvent is made to dissolve or suspend with PLGA or PLA, It is also a manufacturing method of the nano particle for intravenous injections aiming at targeting and the gradual release giving a surface-active agent to the surface of PLGA or a PLA nano particle by adding in the solution containing a surface-active agent.

[0010]

More concrete this invention is the above-mentioned manufacturing method of the nano particle for intravenous injections, wherein the diameter of PLGA obtained or a PLA nano particle is 50-300 nm.

Still more concrete this invention is a manufacturing method of the above-mentioned nano particle for intravenous injections, wherein the molecular weight of the water-soluble nonpeptidic low molecule drugs enclosed with PLGA or a PLA nano particle is 1000 or less.

[0011]

Concrete this invention is a manufacturing method of the above-mentioned nano particle for intravenous injections with which metal ion combined with water-soluble nonpeptidic low molecule drugs is characterized by being either zinc, iron, copper, nickel, beryllium, manganese or cobalt.

[0012]

Specifically, this invention is a manufacturing method of the above-mentioned nano particle for intravenous injections with which the water-soluble nonpeptidic low molecule drugs made to enclose with PLGA or a PLA nano particle are characterized by having a phosphate group or a carboxyl group in intramolecular further again.

[0013]

More specifically, this invention is a manufacturing method of the above-mentioned nano particle for intravenous injections, wherein these water-soluble nonpeptidic low molecule drugs are a steroidal anti-inflammatory drug, a non-steroidal anti-inflammatory drug, prostanoids, an antimicrobial drug, or a anticancer drug.

[0014]

The surface-active agent which more specifically covers the surface of PLGA which enclosed water-soluble nonpeptidic low molecule drugs, or a PLA nano particle further again this invention, It is a manufacturing method of the above-mentioned nano particle for intravenous injections being polyoxyethylene polyoxypropylene glycols, polysorbates, polyoxyethylene octylphenyl ether, lecithin, or polyvinyl alcohol.

[0015]

This invention is the anti-inflammation and the antirheumatic which provide the treating agent which contains the nano particle obtained above as another mode as an active principle, and contain in detail the nano particle which enclosed water-soluble steroid as an active principle further again.

[Best Mode of Carrying Out the Invention]

[0016]

As described above, fundamentally, this invention consists of biodegradable PLGA or the nano particle of PLA, water-soluble nonpeptidic low molecule drugs combined with the metal ion enclosed in the nano particle, and a surface-active agent given to the nano particle surface concerned.

Namely, the nano particle for intravenous injections aiming at targeting of this invention and gradual release, The water-soluble nonpeptidic low molecule drugs which carried out hydrophobing with metal ion are enclosed with PLGA or a PLA nano particle, and it consists of having given the surface-active agent to the surface of the PLGA concerned or a PLA nano particle.

[0017]

In this case, it became clear that that the diameter of the nano particle of this invention is 50-300 nm was a suitable range which is easy to be incorporated into a lesion region. That is, in less than 50 nm, particles are too small, and are incorporated to except a lesion region, and particle diameter is not preferred. When particle diameter exceeds 300 nm, it will be incorporated into an intracellular hide system and is not desirable.

[0018]

On the other hand, it is one feature to combine the low molecule drugs concerned with metal ion, and to make the drugs themselves into hydrophobicity, in order to make water-soluble nonpeptidic low molecule drugs enclose efficiently in a nano particle. Therefore, as metal ion used, it is preferred that it is zinc ion, iron ion, a copper ion, nickel ion, beryllium ion, manganese ion, or cobalt ion. Also in it, zinc ion or especially iron ion is preferred. Therefore, in this invention, as for the water-soluble nonpeptidic low molecule drugs enclosed with PLGA or a PLA nano particle, it is preferred to contain a phosphate group or a carboxyl group in intramolecular so that it may combine with such metal ion and hydrophobing may be easy to be carried out.

It is preferred for water-soluble nonpeptidic low molecule drugs that a molecular weight is 1,000 or less.

[0019]

Although various drugs can be mentioned as said water-soluble nonpeptidic low molecule drugs, it is preferred especially that it is water-soluble steroidal anti-inflammatory drug, non-steroidal anti-inflammatory drug, prostanoids, antimicrobial drug, or anticancer drug.

[0020]

More specifically as a steroidal anti-inflammatory drug, they are phosphoric acid betamethasone, phosphoric acid dexamethasone, phosphoric acid prednisolone, phosphoric acid hydrocortisone, prednisolone succinate, hydrocortisone succinate, etc.

As a non-steroidal anti-inflammatory drug, they are loxoprofen sodium, dichlofenac sodium, etc.

As prostanoids, it is PGE₁, for example and a vancomycin, chloramphenicol succinate, latamoxef, cefpirome,

clindamycin phosphate, Carmo Nahm, etc. can be mentioned as an antimicrobial drug. As a anticancer drug, although vincristine, vinblastine, etc. are mentioned, it is not limited to these.

[0021]

As a manufacturing method of the nano particle for intravenous injections which this invention provides, it can specifically carry out as follows. Namely, hydrophobing of the water-soluble aforementioned nonpeptidic low molecule drugs is carried out by making it combine with metal ion, It can prepare by making it dissolve or suspend in a water soluble organic solvent with PLGA or PLA, and adding and stirring this solution or suspension in the solution containing a surface-active agent.

[0022]

Although it cannot generally limit as a water soluble organic solvent to be used, acetone, acetonitrile, ethanol, methanol, propanol, dimethylformamide, dimethyl sulfoxide, dioxanes, or these mixed solvents are preferred.

As a surface-active agent to be used, polyoxyethylene polyoxypropylene glycols, polysorbates, polyoxyethylene octylphenyl ether, lecithin, and polyvinyl alcohol are preferred.

[0023]

After centrifugality, gel filtration, fiber dialysis, or an ultrafiltration refines the nano particle of this invention manufactured in this way, it is preferred for it to freeze-dry and save in consideration of the stability of PLGA which is a base material, or PLA.

In order to re-suspend the freeze-dried pharmaceutical preparation and to be able to prescribe it for the patient in that case, it is preferred to add and freeze-dry a stabilizing agent and an isotonizing agent. As such a stabilizing agent and an isotonizing agent, sucrose or trehalose can be mentioned and the addition is good to add so that it may become more than 5 time weight to pharmaceutical preparation.

[0024]

By prescribing a medicine for the patient into a vein, the nano particle of this invention prepared as mentioned above carries out targeting of various kinds of inflammation part, vascular lesion part, infection part, and malignant tumor tissues, and accumulates them on the part or organization efficiently. Subsequently, the water-soluble nonpeptidic low molecule drugs enclosed in particles on that spot are emitted continuously, and the bioactive of the drugs concerned is demonstrated. If it is especially in the nano particle of this invention, it is one feature again that the initial burst phenomenon from particles is controlled by operation of metal ion, and the drugs concerned are released gradually over a long period of time about the water-soluble nonpeptidic low molecule drugs enclosed in particles. Therefore, in order to use this nano particle as pharmaceutical preparation, it is important to control an enclosure rate, a discharge action, etc. of a surface physical property, particle diameter, and water-soluble nonpeptidic low molecule drugs of a nano particle according to the purpose. For example, the surface physical property of a nano particle is controllable by changing the kind of surface-active agent.

[0025]

The particle diameter of a nano particle is also more important also for the nano particle which has what particle diameter considering whether it is efficiently incorporated into each lesion region (an inflammation part, a vascular lesion part, an infection part, and malignant tumor tissue), and adjusting the particle diameter than affecting a moving state in the living body greatly. The agitating speed of the aqueous phase at the time of preparing a nano particle, quantity of an organic solvent, dropping speed of an organic solvent to be used, etc. can perform adjustment of this particle diameter.

[0026]

In PLGA of water-soluble nonpeptidic low molecule drugs, or enclosure into a PLA nano particle, the physical

properties of the low molecule drugs concerned involve greatly. Generally, the drugs of hydrophilic nature (water solubility) of the enclosure rate to the inside of PLGA or a PLA nano particle are lower as compared with hydrophobic drugs. Therefore, in this invention, it is required for the drugs concerned by combining water-soluble nonpeptidic low molecule drugs with metal ion to give hydrophobicity. This hydrophobic grant becomes possible by combining water-soluble nonpeptidic low molecule drugs with metal ion, and making insoluble precipitation more specifically form.

[0027]

For that purpose, it is preferred to introduce a functional group called the phosphate group or carboxyl group which can be combined with metal ion into the intramolecular of water-soluble nonpeptidic low molecule drugs. When the functional group which checks the functional group thru/or precipitation formation which does not participate in precipitation formation with metal ion is in the pharmaceutical molecule concerned, it is necessary to achieve optimization of protecting this functional group by a suitable protective group.

Since the kind of organic solvent, the quantity, and the dropping speed of an organic solvent to be used also affect adjustment of the particle diameter of a nano particle and also affect the enclosure rate of water-soluble nonpeptidic low molecule drugs, it is necessary to carry out the optimization.

[0028]

The gradual release speed of the water-soluble nonpeptidic low molecule drugs enclosed in particles is controllable by using PLGA and PLA of a different molecular weight also about PLGA or PLA used as the base material which constitutes a nano particle.

In order to evaluate the nano particle provided by this invention, it is important to build in vitro or an animal (in vivo) model suitable for examination of PK/PD (pharmacokinetics and metabolism and pharmacological action).

[0029]

As described above, in this invention, it became possible using metal ion to high-enclose the drugs concerned in PLGA or a PLA nano particle by giving hydrophobicity to water-soluble nonpeptidic low molecule drugs. Therefore, the nano particle for intravenous injections which can carry out targeting of the water-soluble nonpeptidic low molecule drugs to a lesion region, and a gradual release operation of the drugs concerned over a long period of time maintains in a lesion region by this invention is manufactured by a simple method [dominance /-izing / mass-production].

[Working example]

[0030]

An embodiment and the example of an examination explain this invention in detail below.

[0031]

Embodiment 1: Precipitation formation of the water-soluble nonpeptidic low molecule drugs by metal ion

As a water-soluble nonpeptidic low molecular weight compound which has a phosphate group, the compound of the description was used all over the following table. The 0.2 M-Tris chloride buffer solution (pH 7.8) which dissolved each compound by the concentration of 20mM was added in the metal-ion-water solution (100mM) of equivalent weight of versatility, and muddiness of the addition liquid in that case was observed.

The result was shown in the 1st table.

[0032]

1st Table: Formation of Precipitation by Metal Ion of Water-soluble Nonpeptidic Low Molecular Weight Compound

[0033]

[Table 1]

| | | 水溶性非ペプチド性低分子化合物 | | | | |
|-----------------------|--------------------------------------|-----------------|---------------|----------------|---------------|----------------------------------|
| | | ナフテルリン酸 | リン酸 ベタメサゾン | リン酸 デキサメサゾン | リン酸 リボフラビン | Tris-HCl 緩衝液 (0.1M/pH 7.8) |
| 金 属 イ オ ン | NiCl ₂ | — | — | + | — | — |
| | CuCl ₂ | — | +++ | +++ | +++ | — |
| | Zn(CH ₃ COO) ₂ | +++ | +++ | +++ | +++ | — |
| | ZnCl ₂ | +++ | +++ | +++ | +++ | — |
| | MgCl ₂ | — | — | — | — | — |
| | FeCl ₂ | +++ | +++ | +++ | +++ | — |
| | FeCl ₃ | +++ | +++ | +++ | +++ | — |
| | 3N HCl | — | — | — | — | — |

[0034]

-: -- a solution state and +: -- observation and ++: muddiness have slight muddiness, +++: muddiness arises, and precipitation forms

[0035]

As for the compound which has a phosphate group, muddiness and precipitation formation were observed by existence of zinc, iron (bivalence or trivalence), and copper metal ion so that it might become clear from the result in front.

As a result of replacing the mole ratio of zinc ion with phosphoric acid betamethasone or phosphoric acid riboflavin and analyzing the amount of precipitation formation, it became clear that precipitation of a low molecular weight compound produced all in about one in a mole ratio with zinc ion.

[0036]

Embodiment 2: Manufacture of a steroid enclosure PLGA/PLA nano particle

Various steroid was dissolved in underwater [of 100μmol], and it added in 0.5M zinc acetate solution or first ferrum water solution of 0.5M chloride 500μmol. 12,000 rpm/centrifugality for 5 minutes was performed, supernatant liquid was removed, and precipitation of zinc-steroid or iron-steroid was obtained. 500μmol addition of acetone, the acetone / acetonitrile mixed liquor, or the acetone/ethanol mixture which dissolved PLGA (made by Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) or PLA(made by Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)20mg into these settlements was done. Furthermore zinc acetate solution was added and this solution (or suspension) was stirred at 400 rpm after standing with the room temperature for 2 hours. It added through the syringe of 27G the speed for 1-ml/in 0.5%PluronicF68 (nonionic polymer surfactant) solution. The obtained nano particle added and carried out centrifugality of 0.4 times the amount of the EDTA solution (pH 8) of 0.5M after neglect for 20,000g 20 minutes, stirring at a room temperature for 1 to 2 hours. After removing supernatant liquid, water was added and it acted as Kiyoshi of the nano particle by

*** by centrifugality again. Under [a fixed quantity / in HPLC / quantity / of the steroid in a nano particle / the obtained nano particle decomposes PLGA/PLA in a 2N-NaOH aqueous solution and]. The nano particle prepared without adding metal ion is related with nonaqueous solubility steroid, and it is the bottom in fixed quantity similarly. It is the bottom about a fixed quantity of quantity of the phosphoric acid betamethasone which dissolved the precipitation in which 5 mg of phosphoric acid betamethasone was made to form with zinc in acetone of various quantity, and was similarly enclosed in the nano particle.

The result was shown in the 2nd table and the 3rd table.

[0037]

Table 2: Enclosure of steroid into PLGA nano particle

[0038]

[Table 2]

| ステロイド | ヘタメサゾン | 酢酸ヘタメサゾン | BDP | BP・Na | BP・Zn |
|---------------------|--------|----------|-------|-------|-------|
| ステロイド／ナノ粒子 (重量%) | 0.01 | 0.15 | 0.47 | 0 | 2.03 |
| ステロイド | BP・Fe | DP・Na | DP・Zn | HP・Na | HP・Zn |
| ステロイド／ナノ粒子 (重量%) | 1.15 | 0 | 1.15 | 0 | 1.05 |

[0039]

BDP: Betamethasone dipropionate

BP: Phosphoric acid betamethasone

DP: Phosphoric acid dexamethasone

HP: Phosphoric acid hydrocortisone

[0040]

3rd Table: Influence of the Amount of Acetone Exerted on Enclosure Rate of Phosphoric Acid Betamethasone into PLGA Nano Particle

[0041]

[Table 3]

| アセトン量 (μl) | 500 | 700 | 900 | 1100 | 1300 | 1500 |
|------------------|-----|------|------|------|------|------|
| ステロイド／ナノ粒子 (重量%) | 注 | 7.34 | 4.28 | 3.46 | 2.71 | 1.93 |

[0042]

Notes: Particles condense and measurement is impossible.

[0043]

As shown in the 2nd table, when phosphoric acid steroid is sodium salt, It became clear that the enclosure rate into a PLGA nano particle increased notably by having used precipitation (BP-Zn, BP-Fe, DP-Zn, HP-Zn) of the phosphoric acid steroid produced by addition of zinc or ferrous ion to not being enclosed in a nano particle at all. When PLGA and the amount of phosphoric acid betamethasone are set constant and the amount of acetone of the solvent is changed so that clearly from the result shown in the 3rd table, the nano particle has condensed below by 500microl, but. In 700microl, the dispersion stability was high, the nano particle by which high concentration enclosure of the phosphoric acid betamethasone was carried out was prepared, and it became clear that an enclosure rate becomes low gradually in the amount of acetone beyond it although a dispersion stability is high.

[0044]

Embodiment 3 : P Discharge action of the steroid from LGA / PLA nano particle

5 mg of phosphoric acid betamethasone was dissolved in underwater [of 100microl], and it added in 0.5M zinc acetate solution 500mul. Centrifugality was carried out in 12,000 rpm/5 minutes, supernatant liquid was removed, and precipitation of zinc-steroid was obtained. 500microl addition of the acetone which dissolved various PLGA(s) or PLA20mg from which a molecular weight differs in these settlings was done. It added through 27G syringe the speed for 1-ml/in 0.5%PluronicF68 (nonionic polymer surfactant) which stirred this solution at 1,400 rpm after standing with the room temperature for 2 hours, or lecithin suspension. The obtained nano particle carried out concentration washing with the ultrafiltration (Amicon make: centriprepYM-10), after adding EDTA after neglect, stirring at a room temperature for 1 to 2 hours. This nano particle was suspended so that it might become 500microg/mL as

PLGA concentration into FBS (fetal calf serum)/PBS (v/v=1), the EDTA solution of 0.5M of predetermined time of after 1 / 2.5 volume (pH 8) was added, and the at-long-intervals heart was carried out at 20,000 g for 30 minutes. After removing supernatant liquid, water was added and centrifugality washed the nano particle again. Under [a fixed quantity / in HPLC / amount / of steroid / in a nano particle / the obtained nano particle decomposes PLGA/ PLA in a 2N-NaOH aqueous solution and].

A fixed quantity was similarly carried out about the nano particle which enclosed BDP (betamethasone dipropionate) of the hydrophobic steroid prepared as comparison and contrast by the method for which this invention person etc. have applied previously (application for patent 2002-159190).

The result was shown in the 4th table.

[0045]

Table 4 Betamethasone discharge action from nano particle

[0046]

[Table 4]

| PLGA/PLA | ベタメサゾンの累積放出量(%) | | | | | | |
|------------------------|-----------------|-----|-----|-----|-----|------|------|
| | 5 時 間 | 1 日 | 2 日 | 4 日 | 8 日 | 11 日 | 20 日 |
| PLA * 1 (Mw 14000) | 27 | 53 | 64 | 79 | 97 | 98 | 100 |
| PLGA * 2 (Mw 8000) | 0 | 17 | 29 | 35 | 60 | 70 | 93 |
| PLGA * 2 (Mw 13000) | 0 | 11 | 18 | 34 | 47 | 53 | 62 |
| PLA * 2 (Mw 9000) | 0 | 12 | 13 | 25 | 28 | 30 | 38 |
| PLA * 2 (Mw 14000) | 0 | 3 | 4 | 8 | 10 | 14 | 31 |

[0047]

*1: The nano particle adjusted to the application for patent 2002-159190 by the method of the description

*2: The nano particle prepared by this invention method

[0048]

From the nano particle which enclosed BDP (betamethasone dipropionate) of the hydrophobic steroid prepared by the method for which this invention person etc. have applied previously (application for patent 2002-159190). If it is in the nano particle prepared by this invention method to betamethasone being emitted in an early stage and about 90 percent or more of betamethasone being emitted from the nano particle in six days, Early burst release is controlled remarkably and it became clear that steroid was emitted further gradually also after that.

It became clear that steroid was early emitted more for the nano particle prepared using PLGA rather than the nano particle which steroid is emitted at an early stage, and the direction of the nano particle prepared using PLGA or PLA with a small molecular weight prepared using PLA.

[0049]

Embodiment 4: The discharge action of the steroid from a nano particle incorporated into the macrophage

The macrophage was extracted from the abdominal cavity of the mouse which injected 1.5 ml of proteose peptone intraperitoneally 10%, and was stimulated, seeding was carried out by 6×10^5 cells/12well, and it cultivated by the macrophage SFM culture medium (made by Gibco) overnight. The PLGA nano particle or PLA nano particle prepared according to Embodiment 3 was added after exchanging culture media, and it incubated at 37 ** for 2 hours.

After washing a cell 8 times by PBS and a culture medium, under [a fixed quantity / method / ELISA / amount / of betamethasone / which is contained in a culture medium for every predetermined time].

The nano particle which enclosed BDP (betamethasone dipropionate) of the hydrophobic steroid prepared as comparison and contrast by the method for which this invention person etc. have applied previously (application for patent 2002-159190) was added, and it inquired similarly.

The result was shown in the 5th table.

5th Table: Betamethasone Discharge Action from Macrophage Which Incorporated Nano Particle

[0050]

[Table 5]

| | ベタメサゾン 累積放出量 (%) | | | | | | | |
|--------------|------------------|------|-------|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 2 時間 | 4 時間 | 10 時間 | 1 日 | 2 日 | 3 日 | 5 日 | 7 日 |
| 対照ナノ粒子 * 1 | 26 | 42 | 68 | 86 | 96 | 97 | 98 | 99 |
| 本発明のナノ粒子 * 2 | 8 | 4 | 11 | 27 | 64 | 77 | 89 | 96 |

[0051]

*1: Prepare a nano particle using PLA (Mw14000) (application for patent 2002-159190).

*2: Prepare a nano particle using PLGA (Mw8000).

[0052]

From the nano particle which enclosed BDP (betamethasone dipropionate) of the hydrophobic steroid prepared by the method for which the inventor etc. have applied previously (application for patent 2002-159190). To betamethasone being emitted in an early stage and most being emitted in two days, till about 2 - three days after, in the case of the nano particle prepared by this invention method, the action near zero-order discharge was shown, and it became clear to it that it continues being emitted gently also after that.

[0053]

Embodiment 5: Dispersion-stability evaluation of a nano particle

The nano particle was obtained by dropping the acetone solution prepared according to Embodiment 3 at underwater [which dissolved various surface-active agents]. After condensing, washing and refining the obtained nano particle and freeze-drying in the sucrose solution of various concentration, adding water again estimated the redispersibility of the nano particle with the light scattering meter.

[0054]

The nano particle prepared using the solution containing the surface-active agent of lecithin, polyoxyethylene polyoxypropylene glycols, or polysorbates, Even if it was in the case of which, when becoming a nano particle which has the almost same particle diameter and changing the concentration of a surface-active agent by 0.01 to 1% of within the limits, even if it was, the big difference to the particle diameter of a nano particle, a dispersion stability, and a phosphoric acid betamethasone enclosure rate was not accepted.

However, in the nano particle which was dropped at the polyvinyl alcohol solution and prepared, compared with the nano particle prepared with other surface-active agents, particle diameter became large, and the phosphoric acid betamethasone enclosure rate was also low. It became clear by adding and carrying out lyophilization treatment of the sucrose more than 5 time weight to nano particle weight that the redispersibility of the nano particle after freeze-drying was maintained.

[0055]

Embodiment 6: Accumulation nature to the inflammation part of a nano particle

the Lewis system male rat left rear -- a leg -- 100microl administration of a carrageenin content physiological saline was done 1%, and inflammation was made to cause in the corium solae The mean particle diameter which enclosed the rhodamine 4 hours afterward carried out single-dose administration of the nano particle which has 200 nm or 500 nm from the caudal vein. A leg edema was excised 2 hours after administration, the frozen section was produced with

cryostat, and the organization was observed with the fluorescence microscope.

The administration group of only a physiological saline and the administration group of only a rhodamine were set as a comparative example.

[0056]

In the group which prescribed for the patient the nano particle whose mean particle diameter is 200 nm, the fluorescence intensity of section tissue images was increasing remarkably as compared with the section tissue images of the group which prescribed only the physiological saline of contrast for the patient, and it became clear that the nano particle was piling up the inflammation part.

The accumulation nature to the inflammation part was not accepted in the group which prescribed only the rhodamine for the patient, or the group which prescribed for the patient the nano particle whose mean particle diameter is 500 nm.

[0057]

Embodiment 7: Adjuvant arthritis depressant action

A with a weights [130-160g] 7-week old Lewis system rat After preliminary breeding for one week, the bottom of anesthesia -- 6 mg/mL M.Butyricum Desiccated (made by DIFCO) content -- age -- band Incomplete Freund (made by DIFCO) solution 50mul -- the left rear -- a leg -- it injected in the planta hide and arthritis was made to cause M. 14 days after Butyricum administration and the left rear -- a leg -- a group which divided capacity into the index so that there might be no distance between each experimental group -- the single intravenous dose of the PLA nano particle which enclosed phosphoric acid betamethasone with the rat was carried out.

The single intravenous dose of a single subcutaneous dose or Limethason (made by Mitsubishi Pharma Corp.) was carried out for phosphoric acid betamethasone or phosphate buffered saline (PBS) to the rat of other groups as contrast, respectively.

The inflammation depressant action of arthritis was analyzed before medication by measuring the left hind-foot capacity for after-administration seven days by a water displacement method.

The obtained result was shown in the 6th table.

[0058]

6th Table: Adjuvant Arthritis Depressant Action by Nano Particle

[0059]

[Table 6]

| 投 与 群 | 投 与 後 (日) の 炎 症 率 * 3 (%) | | | | | | |
|------------------------|-------------------------------|------|------|------|------|------|------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| 本発明のナノ粒子*1 | 69.0 | 68.7 | 68.3 | 69.0 | 70.3 | 70.8 | 71.3 |
| リメタゾン*2 | 66.9 | 72.0 | 79.2 | 78.5 | 80.0 | 79.0 | — |
| リン酸ヘキサメタリン (300 μ g) | 68.3 | 76.5 | 79.2 | 81.7 | 88.0 | — | 84.8 |
| リン酸ヘキサメタリン (100 μ g) | 78.4 | 80.0 | 82.8 | 85.4 | 84.2 | 88.0 | 81.7 |
| 生理食塩水 | 100.8 | 98.1 | 98.0 | 96.7 | 96.0 | 95.5 | 96.2 |

[0060]

*1: PLA (Mw14000) was used and the nano particle which enclosed phosphoric acid betamethasone was prepared. The quantity which is equivalent to 100microg as phosphoric acid betamethasone is prescribed for the patient.

*2: Prescribe for the patient the quantity which converts into phosphoric acid dexamethasone and is equivalent to 100microg.

*3: The rate of inflammation is based on the following formulas.

Rate of inflammation (%) =(measured leg capacity - age band leg capacity unprescribed a medicine for the patient)/ (leg capacity before medication - age band leg capacity unprescribed a medicine for the patient) x100

[0061]

As shown in the 6th table, the administration group of Limethason which is the steroidal anti-inflammatory agent already used clinically showed anti-inflammatory activity comparable as the case where triple the amount of phosphoric acid betamethasone is prescribed for the patient, one day after administration. The anti-inflammatory activity became weaker gradually after that like the case where only phosphoric acid betamethasone is prescribed for the patient. On the other hand, in the administration group of the PLA nano particle which enclosed the phosphoric acid betamethasone of this invention, strong anti-inflammatory activity comparable as Limethason was shown one day after administration, and strong anti-inflammatory activity was maintained over seven days after that.

[0062]

Embodiment 8 : Preparation of the PLGA/PLA nano particle which enclosed GE₁

1-mg PGE₁ was dissolved in the ethanol of 20microl, and it added in ferrum water solution 80mul for a start [0.5M chloridation] (or the second). 12,000 rpm/centrifugality for 5 minutes was performed, supernatant liquid was removed, and precipitation of iron-PGE₁ was obtained. The acetone solution which dissolved PLGA (made by Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) or PLA (made by Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) into these settlings was added. Furthermore zinc acetate solution was added and it added through 27G syringe the speed for 1-ml/in 0.5% PluronicF68 (nonionic polymer surfactant) which stirred this solution (or suspension) at 400 rpm after standing with the room temperature for 2 hours, or lecithin suspension. The obtained nano particle added 0.4 times the amount of EDTA solution (pH 8) of 0.5M after neglect, stirring at a room temperature for 1 to 2 hours, and carried out centrifugality at 20,000 g for 20 minutes. After removing supernatant liquid, water was added and centrifugality washed the nano particle again. Under [a fixed quantity / method / ELISA / ₁ / PGE/ the obtained nano particle dissolves into acetonitrile, and it dilutes with PBS and].

It is the bottom in fixed quantity by the ELISA method about the amount of PGE₁ which makes incorporate a PGE₁ enclosure PLGA nano particle into a macrophage like Embodiment 4, and is contained in a culture medium for every predetermined time.

The result was shown in the 7th table.

[0063]

7th Table: PGE₁ Discharge Action from Macrophage Which Incorporated Nano Particle

[0064]

[Table 7]

| | P G E ₁ 累積放出量 (%) | | | | | | | | |
|---------------------------------|--------------------------------|------|-------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 2 時間 | 5 時間 | 10 時間 | 1 日 | 2 日 | 3 日 | 4 日 | 6 日 | 8 日 |
| PGE ₁ 封入 ナ/粒子 * 1 | 22 | 42 | 60 | 75 | 90 | 95 | 98 | 99 | 100 |

[0065]

*1: Prepare a nano particle using PLGA (Mw8,000).

[0066]

The enclosure rates to the inside of the PLGA nano particle of PGE₁ were about 0.1 thru/or about 1 weight %.

Although the gradual release action like the phosphoric acid betamethasone which is a steroidal anti-inflammatory agent was not shown so that it might become clear also from the result shown in the 7th table, it is understood that PGE₁ is continuing being emitted over eight days.

[Industrial applicability]

[0067]

As indicated above, quantity enclosure of the water-soluble nonpeptidic low molecule drugs can be enough carried out into PLGA or a PLA nano particle by this invention, And the initial burst phenomenon of the drugs concerned from particles is controlled, and the nano particle for intravenous injections which can release drugs gradually over a long period of time is provided.

Targeting of the nano particle for intravenous injections provided by this invention is carried out to various kinds of inflammation part, vascular lesion part, infection part, and malignant tumor tissues, and it is efficiently accumulated on the part or organization. Subsequently, the usefulness on the Medical Science Division is greater than emit continuously the water-soluble nonpeptidic low molecule drugs enclosed in particles on that spot and demonstrating the bioactive of the drugs concerned.

[Translation done.]

| (51) Int. Cl. | F I | テーマコード (参考) |
|-----------------------------------|---------------|-------------|
| A 6 1 K 9/51 (2006.01) | A 6 1 K 9/51 | 4 C 0 7 6 |
| A 6 1 K 45/00 (2006.01) | A 6 1 K 45/00 | 4 C 0 8 4 |
| A 6 1 K 47/34 (2006.01) | A 6 1 K 47/34 | 4 C 0 8 6 |
| A 6 1 K 47/32 (2006.01) | A 6 1 K 47/32 | |
| A 6 1 K 47/44 (2006.01) | A 6 1 K 47/44 | |
| 審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全18頁) 最終頁に続く | | |

(21) 出願番号 特願2006-507664 (P2006-507664)
 (86) (22) 出願日 平成16年3月11日 (2004.3.11)
 (85) 翻訳文提出日 平成17年7月8日 (2005.7.8)
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2004/003246
 (87) 国際公開番号 WO2004/084871
 (87) 国際公開日 平成16年10月7日 (2004.10.7)
 (31) 優先権主張番号 特願2003-84695 (P2003-84695)
 (32) 優先日 平成15年3月26日 (2003.3.26)
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)

(71) 出願人 303010452
 株式会社 L T T バイオファーマ
 東京都港区愛宕2丁目5番1号
 (74) 代理人 100083301
 弁理士 草間 攻
 (72) 発明者 石原 務
 東京都大田区中央5-24-14-101
 (72) 発明者 水島 裕
 東京都港区六本木6-12-3-2402
 Fターム (参考) 4C076 AA65 AA67 BB13 CC04 CC27
 CC31 EE06A EE23A FF31 GG23
 4C084 AA17 MA05 NA12 NA13 ZB111
 ZB151 ZB261 ZB311

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ターゲッティングと徐放を目的とした静脈注射用ナノ粒子

(57) 【要約】

病変部位へ水溶性非ペプチド性低分子医薬品をターゲッティングし、病変部位において当該医薬品を徐放することが可能である水溶性非ペプチド性低分子医薬品含有の乳酸-グリコール酸共重合体 (PLGA) または乳酸重合体 (PLA) ナノ粒子を提供するものである。当該ナノ粒子は、金属イオンと結合することにより疎水化した水溶性非ペプチド性低分子医薬品を、PLGAまたはPLAナノ粒子に封入し、界面活性剤を当該ナノ粒子表面に吸着させたことからなるものである。

【特許請求の範囲】

【請求項1】

金属イオンにより疎水化した水溶性非ペプチド性低分子医薬品を、乳酸-グリコール酸共重合体または乳酸重合体ナノ粒子に封入し、界面活性剤を当該乳酸-グリコール酸共重合体または乳酸重合体ナノ粒子の表面に持たせたことからなることを特徴とするターゲッティングと徐放を目的とした静脈注射用ナノ粒子。

【請求項2】

粒子の直径が50～300nmであることを特徴とする請求項1に記載の静脈注射用ナノ粒子。

【請求項3】

水溶性非ペプチド性低分子医薬品の分子量が1000以下であることを特徴とする請求項1に記載の静脈注射用ナノ粒子。

【請求項4】

金属イオンが、亜鉛、鉄、銅、ニッケル、ベリリウム、マンガンまたはコバルトのいずれかであることを特徴とする請求項1に記載の静脈注射用ナノ粒子。

【請求項5】

水溶性非ペプチド性低分子医薬品が、前記金属イオンにより疎水化されやすいようにリン酸基を有していることを特徴とする請求項1に記載の静脈注射用ナノ粒子。

【請求項6】

水溶性非ペプチド性低分子医薬品が、前記金属イオンにより疎水化されやすいようにカルボキシル基を有していることを特徴とする請求項1に記載の静脈注射用ナノ粒子。

【請求項7】

水溶性非ペプチド性低分子医薬品が、ステロイド性抗炎症薬、非ステロイド性抗炎症薬、プロスタノイド、抗微生物薬または抗癌薬であることを特徴とする請求項1に記載の静脈注射用ナノ粒子。

【請求項8】

界面活性剤が、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコール類、ポリソルベート類、ポリオキシエチレンオクタフルフェニルエーテル類、レシチンまたはポリビニルアルコールであることを特徴とする請求項1に記載の静脈注射用ナノ粒子。

【請求項9】

水溶性非ペプチド性低分子医薬品を金属イオンにより疎水化し、乳酸-グリコール酸共重合体または乳酸重合体と共に水溶性有機溶媒に溶解または懸濁させ、界面活性剤を含有する水溶液中に添加することによりナノ粒子の表面に界面活性剤を持たせたことを特徴とするターゲッティングと徐放を目的とした静脈注射用ナノ粒子の製造方法。

【請求項10】

粒子の直径が50～300nmであることを特徴とする請求項9に記載の静脈注射用ナノ粒子の製造方法。

【請求項11】

水溶性非ペプチド性低分子医薬品の分子量が1000以下であることを特徴とする請求項9に記載の静脈注射用ナノ粒子の製造方法。

【請求項12】

金属イオンが、亜鉛、鉄、銅、ニッケル、ベリリウム、マンガンまたはコバルトのいずれかであることを特徴とする請求項9に記載の静脈注射用ナノ粒子の製造方法。

【請求項13】

水溶性非ペプチド性低分子医薬品が、前記金属イオンにより疎水化されやすいようにリン酸基を有していることを特徴とする請求項9に記載の静脈注射用ナノ粒子の製造方法。

【請求項14】

水溶性非ペプチド性低分子医薬品が、前記金属イオンにより疎水化されやすいようにカルボキシル基を有していることを特徴とする請求項9に記載の静脈注射用ナノ粒子の製造方法。

10

20

30

40

50

【請求項 15】

水溶性非ペプチド性低分子医薬品が、ステロイド性抗炎症薬、非ステロイド性抗炎症薬、プロスタノイド、抗微生物薬または抗癌薬であることを特徴とする請求項 9 に記載の静脈注射用ナノ粒子の製造方法。

【請求項 16】

界面活性剤が、ポリオキシエチレンポリオキシシロピレングリコール類、ポリソルベート類、ポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテル類、レシチンまたはポリビニルアルコールであることを特徴とする請求項 9 に記載の静脈注射用ナノ粒子の製造方法。

【請求項 17】

水溶性ステロイドを封入したナノ粒子を有効成分として含有する抗炎症、抗リウマチ剤 10

【請求項 18】

水溶性ステロイドが、リン酸ベタメサゾンである請求項 17 に記載の抗炎症、抗リウマチ剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明はターゲティングと徐放を目的とした、水溶性非ペプチド性低分子医薬品を封入した静脈注射用ナノ粒子、およびその製造方法に関する。詳細には、病変部位への水溶性非ペプチド性低分子医薬品のターゲティングと、病変部位での当該薬物の徐放を目的とした、静脈注射用ナノ粒子、およびその製造方法に関する。 20

【背景技術】

【0002】

これまでに、水溶性低分子医薬品を封入した乳酸-グリコール酸共重合体 (PLGA) または乳酸重合体 (PLA) のマイクロ粒子ないしナノ粒子が、多くの研究者により開発・提案されてきている。例えば、米国特許第 4,652,441 号には、生物活性ポリペプチドを含有する PLGA 等のマイクロカプセルおよびその製法が開示されており、また特表平 10-511957 号公報には、種々の薬物を含有する、血管内投与可能な PLGA 等のナノ粒子が開示されている。さらに、特開平 8-217691 号公報には、水溶性ペプチド性生体活性物質の水不溶性または水難溶性多価金属塩を、PLGA 等のマイクロカプセルに封入した徐放性製剤が開示されている。 30

【0003】

しかしながらこれらの先行特許においては、水溶性非ペプチド性低分子医薬品を金属イオンにより疎水化したのちナノ粒子に封入することによりターゲティングと徐放を目的とした静脈注射用ナノ粒子についてはなんら言及も示唆もされていない。

本発明者等も、乳酸-グリコール酸共重合体 (PLGA) または乳酸重合体 (PLA) のナノ粒子からなる製剤について、特許出願を行ってきている (特願 2002-159190)。しかしながら、本発明者等が提案したナノ粒子では、水溶性低分子医薬品のナノ粒子内への封入率は低いものであった。また、エステル化などを行うことにより水溶性低分子医薬品の疎水性を高めた場合には、当該医薬品のナノ粒子内への封入率は向上するものの、封入された薬物の徐放期間が短いものであり、徐放性は十分とはいえないものであった。 40

したがって本発明は、水溶性非ペプチド性低分子医薬品を粒子内に封入することができ、かつ、粒子からの当該医薬品の初期バースト現象を抑制し、長期間にわたり医薬品を徐放することが可能であるとともに、病変部位へのターゲティングが可能である、静脈注射用ナノ粒子を提供することを目的とする。

また、本発明は、かかる静脈注射用ナノ粒子について、医薬品化のための大量調製に適した、簡便なその調製法を提供することを課題とする。

【0004】

かかる課題を解決するために、本発明者等は、水溶性非ペプチド性低分子医薬品と金属イ 50

オンとの相互作用に着目した。すなわち、水溶性非ペプチド性低分子医薬品を、金属イオンと結合させることにより疎水性をもたせることにより、PLGAまたはPLAのナノ粒子内への封入を検討した。その結果、金属イオンと結合することにより疎水性を有する水溶性非ペプチド性低分子医薬品は、極めて効率よくPLGAまたはPLAのナノ粒子内へ封入し得ることを見出した。さらに、得られたナノ粒子は、粒子からの当該医薬品の放出が徐放的であり、かつ、病変部位への集積性が良好であることより、良好なターゲティングと徐放製剤となり得ることを見出し、本発明を完成させた。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

10

すなわち本発明は、その基本的態様として、金属イオンにより疎水化した水溶性非ペプチド性低分子医薬品を、乳酸-グリコール酸共重合体(PLGA)または乳酸重合体(PLA)ナノ粒子に封入し、界面活性剤を当該PLGAまたはPLAナノ粒子の表面に持たせたことからなることを特徴とするターゲティングと徐放を目的とした静脈注射用ナノ粒子である。

【0006】

より具体的な本発明は、PLGAまたはPLAナノ粒子の直径が、50～300nmであることを特徴とする上記した静脈注射用ナノ粒子である。

さらに具体的な本発明は、PLGAまたはPLAナノ粒子に封入する水溶性非ペプチド性低分子医薬品の分子量が、1000以下であることを特徴とする上記の静脈注射用ナノ粒子である。

20

【0007】

また、具体的な本発明は、水溶性非ペプチド性低分子医薬品と結合させる金属イオンが、亜鉛、鉄、銅、ニッケル、ベリリウム、マンガンまたはコバルトのいずれかであることを特徴とする上記の静脈注射用ナノ粒子である。

さらにまた本発明は、具体的には、PLGAまたはPLAナノ粒子に封入させる水溶性非ペプチド性低分子医薬品が、分子内にリン酸基またはカルボキシル基を有していることを特徴とする上記の静脈注射用ナノ粒子である。

【0008】

より具体的には、本発明は、かかる水溶性非ペプチド性低分子医薬品が、ステロイド性抗炎症薬、非ステロイド性抗炎症薬、プロスタノイド、抗微生物薬または抗癌薬であることを特徴とする上記の静脈注射用ナノ粒子である。

30

さらにまた本発明は、より具体的には、水溶性非ペプチド性低分子医薬品を封入したPLGAまたはPLAナノ粒子の表面を被覆する界面活性剤が、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコール類、ポリソルベート類、ポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテル類、レシチンまたはポリビニルアルコールであることを特徴とする上記の静脈注射用ナノ粒子である。

【0009】

また本発明は、別の態様として、上記したターゲティングと徐放を目的とした静脈注射用ナノ粒子の製造方法であり、詳細には、水溶性非ペプチド性低分子医薬品を、金属イオンにより疎水化し、非ペプチド性低分子医薬品を、PLGAまたはPLAと共に水溶性有機溶媒に溶解または懸濁させ、界面活性剤を含有する水溶液中に添加することによりPLGAまたはPLAナノ粒子の表面に界面活性剤を持たせることを特徴とするターゲティングと徐放を目的とした静脈注射用ナノ粒子の製造方法でもある。

40

【0010】

より具体的な本発明は、得られるPLGAまたはPLAナノ粒子の直径が、50～300nmであることを特徴とする上記した静脈注射用ナノ粒子の製造法である。

さらに具体的な本発明は、PLGAまたはPLAナノ粒子に封入する水溶性非ペプチド性低分子医薬品の分子量が、1000以下であることを特徴とする上記の静脈注射用ナノ粒子の製造法である。

50

【0011】

また、具体的な本発明は、水溶性非ペプチド性低分子医薬品と結合させる金属イオンが、亜鉛、鉄、銅、ニッケル、バリウム、マンガンまたはコバルトのいずれかであることを特徴とする上記の静脈注射用ナノ粒子の製造法である。

【0012】

さらにまた本発明は、具体的には、PLGAまたはPLAナノ粒子に封入させる水溶性非ペプチド性低分子医薬品が、分子内にリン酸基またはカルボキシル基を有していることを特徴とする上記の静脈注射用ナノ粒子の製造法である。

【0013】

より具体的には、本発明は、かかる水溶性非ペプチド性低分子医薬品が、ステロイド性抗炎症薬、非ステロイド性抗炎症薬、プロスタノイド、抗微生物薬または抗癌薬であることを特徴とする上記の静脈注射用ナノ粒子の製造法である。

【0014】

さらにまた本発明は、より具体的には、水溶性非ペプチド性低分子医薬品を封入したPLGAまたはPLAナノ粒子の表面を被覆する界面活性剤が、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコール類、ポリソルベート類、ポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテル類、レシチンまたはポリビニルアルコールであることを特徴とする上記の静脈注射用ナノ粒子の製造法である。

【0015】

さらにまた本発明は、別の態様として上記で得られたナノ粒子を有効成分として含有する治療剤を提供するものであり、詳細には、水溶性ステロイドを封入したナノ粒子を有効成分として含有する抗炎症、抗リウマチ剤である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0016】

上記したように、本発明は基本的には、生分解性のPLGAまたはPLAのナノ粒子、そのナノ粒子中に封入された金属イオンと結合した水溶性非ペプチド性低分子医薬品、および当該ナノ粒子表面に持たせた界面活性剤からなる。

すなわち、本発明のターゲティングと徐放を目的とした静脈注射用ナノ粒子は、金属イオンにより疎水化した水溶性非ペプチド性低分子医薬品を、PLGAまたはPLAナノ粒子に封入し、界面活性剤を当該PLGAまたはPLAナノ粒子の表面に持たせたことからなるものである。

【0017】

この場合において、本発明のナノ粒子の直径が50～300nmであることが病変部位に取り込まれやすい好適な範囲であることが判明した。すなわち、粒径が50nm未満では粒子が小さすぎて病変部位以外で取り込まれ、好ましいものではない。また、粒径が300nmを超える場合には、細胞内皮系に取り込まれてしまい好ましいものではない。

【0018】

一方、水溶性非ペプチド性低分子医薬品をナノ粒子中に効率よく封入させるためには、当該低分子医薬品を金属イオンと結合させ、医薬品自体を疎水性とすることが一つの特徴である。そのために使用される金属イオンとしては、亜鉛イオン、鉄イオン、銅イオン、ニッケルイオン、バリウムイオン、マンガンイオン、コバルトイオンのいずれかであることが好適である。そのなかでも、亜鉛イオンあるいは鉄イオンが特に好ましい。

したがって、本発明において、PLGAまたはPLAナノ粒子に封入される水溶性非ペプチド性低分子医薬品は、これらの金属イオンと結合して疎水化され易いよう、分子内にリン酸基またはカルボキシル基を含有するのが好ましい。

また、水溶性非ペプチド性低分子医薬品は、分子量が1,000以下であることが好適である。

【0019】

前記水溶性非ペプチド性低分子医薬品としては種々の医薬品を挙げることができるが、なかでも、水溶性のステロイド性抗炎症薬、非ステロイド性抗炎症薬、プロスタノイド、

10

20

30

40

50

抗微生物薬あるいは抗癌薬であることが好適である。

【0020】

より具体的には、ステロイド性抗炎症薬としては、リン酸ベタメサゾン、リン酸デキサメサゾン、リン酸プレドニゾロン、リン酸ヒドロコルチゾン、コハク酸プレドニゾロン、コハク酸ヒドロコルチゾン等である。

非ステロイド性抗炎症薬としては、ロキソプロフェンナトリウム、ジクロフェナックナトリウム等である。

プロスタノイドとしては、例えばPGE₁であり、また抗微生物薬としては、バンコマイシン、コハク酸クロラムフェニコール、ラタモキシセフ、セフピロム、リン酸クリンダマイシン、カルモナム等を挙げることができる。また抗癌薬としては、ビンクリスチン、ビンブラスチン等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0021】

本発明が提供する静脈注射用ナノ粒子の製造法としては、具体的には以下のようにして行うことができる。すなわち、前記の水溶性非ペプチド性低分子医薬品を、金属イオンと結合させることにより疎水化させ、PLGAまたはPLAと共に水溶性有機溶媒中に溶解または懸濁させ、この溶解液または懸濁液を、界面活性剤を含有する水溶液中に添加し、攪拌することによって調製することができる。

【0022】

使用する水溶性有機溶媒としては一概に限定できないが、アセトン、アセトニトリル、エタノール、メタノール、プロパノール、ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、ジオキサンあるいはこれらの混合溶媒が好適である。

また、使用する界面活性剤としては、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコール類、ポリソルベート類、ポリオキシエチレンオキシルフェニルエーテル類、レシチン、ポリビニルアルコールが好適である。

【0023】

かくして製造された本発明のナノ粒子は、遠心、ゲル濾過、ファイバー透析あるいは限外濾過により精製した後、基材であるPLGAあるいはPLAの安定性を考慮して、凍結乾燥して保存するのが好適である。

その際、凍結乾燥した製剤を再懸濁して投与できるようにするために、安定化剤および等張化剤を加えて凍結乾燥させることが好適である。そのような安定化剤および等張化剤としては、ショ糖あるいはトレハロースを挙げることができ、その添加量は、製剤に対して5倍重量以上となるように添加するのがよい。

【0024】

以上のようにして調製される本発明のナノ粒子は、静脈内に投与することにより、各種の炎症部位・血管病変部位・感染部位・悪性腫瘍組織をターゲティングし、その部位あるいは組織に効率よく集積する。次いで、その場で粒子中に封入された水溶性非ペプチド性低分子医薬品を持続的に放出し、当該医薬品の生物活性を発揮する。特に本発明のナノ粒子にあつては、粒子内に封入された水溶性非ペプチド性低分子医薬品について、金属イオンの作用により粒子からの初期バースト現象が抑制され、長期間にわたり当該医薬品が徐放されることがまた一つの特徴である。

したがって、このナノ粒子を製剤として利用するためには、ナノ粒子の表面物性・粒径・水溶性非ペプチド性低分子医薬品の封入率および放出挙動などを、目的に応じて制御することが重要である。例えば、ナノ粒子の表面物性は、界面活性剤の種類を変えることにより制御することができる。

【0025】

さらに、ナノ粒子の粒径も体内動態に大きく影響を及ぼすことより、どの程度の粒径を有するナノ粒子が各病変部位（炎症部位・血管病変部位・感染部位・悪性腫瘍組織）に効率よく取り込まれるかを検討し、その粒径を調整することも重要である。かかる粒子径の調整は、ナノ粒子を調製する際の水相の攪拌速度や、使用する有機溶媒の量、有機溶媒の滴下速度などにより行うことができる。

【 0 0 2 6 】

水溶性非ペプチド性低分子医薬品の P L G A または P L A ナノ粒子中への封入は、当該低分子医薬品の物性が大きく関与する。一般的に、親水性（水溶性）の医薬品の方が疎水性の医薬品に比較し、P L G A または P L A ナノ粒子中への封入率は低いものである。したがって本発明においては、水溶性非ペプチド性低分子医薬品を金属イオンと結合させることにより、当該医薬品に疎水性を付与することが必要である。この疎水性付与は、より具体的には、水溶性非ペプチド性低分子医薬品を金属イオンと結合させ、不溶性の沈澱を形成させることで可能となる。

【 0 0 2 7 】

そのためには、水溶性非ペプチド性低分子医薬品の分子内に、金属イオンと結合し得るリン酸基あるいはカルボキシル基といった官能基を導入することが好ましい。なお、当該医薬品分子内に、金属イオンとにより沈澱形成に関与しない官能基ないし沈澱形成を阻害する官能基がある場合には、かかる官能基を適当な保護基で保護するなどの最適化をはかる必要がある。

さらに、使用する有機溶媒の種類や量、有機溶媒の滴下速度もナノ粒子の粒径の調整に影響を与え、水溶性非ペプチド性低分子医薬品の封入率にも影響を及ぼすことから、その最適化をする必要がある。

【 0 0 2 8 】

また、ナノ粒子を構成する基材となる P L G A または P L A についても、異なる分子量の P L G A や P L A を使用することで、粒子中に封入された水溶性非ペプチド性低分子医薬品の徐放速度を制御することができる。

なお、本発明により提供されるナノ粒子の評価を行うためには、P K / P D（薬物動態や薬理作用）の検討に適した *i n v i t r o* あるいは動物（*i n v i v o*）モデルを構築することが重要である。

【 0 0 2 9 】

前記したように、本発明では金属イオンを用い、水溶性非ペプチド性低分子医薬品に疎水性を付与することにより、P L G A または P L A ナノ粒子内に当該医薬品を高封入することが可能となった。したがって、本発明により、病変部位へ水溶性非ペプチド性低分子医薬品をターゲティングすることができ、かつ病変部位において、長期にわたる当該医薬品の徐放作用が持続する静脈注射用ナノ粒子が、大量生産化に優れた簡便な方法により製造されるのである。

【実施例】

【 0 0 3 0 】

以下に本発明を、実施例ならびに試験例にて詳細に説明する。

【 0 0 3 1 】

実施例 1：金属イオンによる水溶性非ペプチド性低分子医薬品の沈澱形成

リン酸基を有する水溶性非ペプチド性低分子化合物として、下記表中に記載の化合物を用いた。各化合物を 20 m M の濃度で溶解した 0. 2 M - T r i s 塩酸緩衝液（p H 7. 8）を、等量の種々の金属イオン水溶液（100 m M）中に添加し、その際の添加液の濁りを観察した。

その結果を第 1 表に示した。

【 0 0 3 2 】

第 1 表：水溶性非ペプチド性低分子化合物の金属イオンによる沈澱の形成

【 0 0 3 3 】

【表 1】

| | | 水溶性非ペプチド性低分子化合物 | | | | |
|-----------------------|--------------------------------------|-----------------|---------------|----------------|---------------|---------------------------------|
| | | ナフチルリン酸 | リン酸 ベタメサゾン | リン酸 デキサメサゾン | リン酸 リボフラビン | Tris-HCl 緩衝液 (0.1M/pH7.8) |
| 金 属 イ オ ン | NiCl ₂ | — | — | + | — | — |
| | CuCl ₂ | — | +++ | +++ | +++ | — |
| | Zn(CH ₃ COO) ₂ | +++ | +++ | +++ | +++ | — |
| | ZnCl ₂ | +++ | +++ | +++ | +++ | — |
| | MgCl ₂ | — | — | — | — | — |
| | FeCl ₂ | +++ | +++ | +++ | +++ | — |
| | FeCl ₃ | +++ | +++ | +++ | +++ | — |
| | 3N HCl | — | — | — | — | — |

10

【 0 0 3 4 】

—：溶解状態、+：わずかな濁りが観察、++：濁りがあり、+++：濁りが生じ沈殿が形成

【 0 0 3 5 】

表中の結果から判明するように、リン酸基を有する化合物は、亜鉛、鉄（二価あるいは三価）、銅金属イオンの存在により濁りや沈殿形成が観察された。

また、リン酸ベタメサゾンあるいはリン酸リボフラビンと亜鉛イオンのモル比を代えて沈殿形成量を解析した結果、いずれも亜鉛イオンとのモル比が約1で低分子化合物の沈殿が生じることが判明した。

【 0 0 3 6 】

実施例 2：ステロイド封入 P L G A / P L A ナノ粒子の製造

種々のステロイドを100 μlの水中に溶解し、0.5 M酢酸亜鉛水溶液あるいは0.5 M塩酸第一鉄水溶液500 μl中に添加した。12,000 rpm/5分間の遠心を行い、上清を除去し、亜鉛-ステロイドあるいは鉄-ステロイドの沈殿を得た。この沈殿物中に、P L G A（和光純薬工業社製）あるいはP L A（和光純薬工業社製）20 mgを溶解したアセトン、アセトン/アセトニトリル混合液あるいはアセトン/エタノール混合液を500 μl添加した。さらに酢酸亜鉛水溶液を添加し、2時間室温で静置後、この溶液（または懸濁液）を400 rpmで攪拌した。0.5% Pluronic F68（非イオン性高分子界面活性剤）水溶液中に1 ml/分の速度で27 Gのシリンジを通して添加した。得られたナノ粒子は、1～2時間室温で攪拌しながら放置後、0.4倍量の0.5 MのEDTA水溶液（pH8）を加え、20,000 g 20分遠心した。上清を除去した後、水を加え再度遠心によりナノ粒子を洗で浄した。得られたナノ粒子は、2N-NaOH水溶液中でP L G A / P L Aを分解し、HPLCにてナノ粒子中のステロイドの量を定量した。また、金属イオンを加えずに調製したナノ粒子を非水溶性ステロイドに関しても同様に定量した。

40

さらに、リン酸ベタメサゾン5 mgを亜鉛により形成させた沈殿を、種々の量のアセトンに溶解し、同様にナノ粒子中に封入されたリン酸ベタメサゾンの量を定量した。その結果を第2表および第3表に示した。

【 0 0 3 7 】

表2：P L G A ナノ粒子内へのステロイドの封入

【 0 0 3 8 】

【表 2】

| ステロイド | ヘキササゾン | 酢酸ヘキササゾン | BDP | BP-Na | BP-Zn |
|---------------------|--------|----------|-------|-------|-------|
| ステロイド*ナノ粒子 (重量%) | 0.01 | 0.15 | 0.47 | 0 | 2.03 |
| ステロイド | BP-Fe | DP-Na | DP-Zn | HP-Na | HP-Zn |
| ステロイド*ナノ粒子 (重量%) | 1.15 | 0 | 1.15 | 0 | 1.05 |

【0039】

10

BDP：ベタメサゾンジプロピオネート

BP：リン酸ベタメサゾン

DP：リン酸デキサメサゾン

HP：リン酸ヒドロコルチゾン

【0040】

第3表：PLGAナノ粒子内へのリン酸ベタメサゾンの封入率に及ぼすアセトン量の影響

【0041】

【表 3】

| アセトン量 (μl) | 500 | 700 | 900 | 1100 | 1300 | 1500 |
|------------------|-----|------|------|------|------|------|
| ステロイド*ナノ粒子 (重量%) | 注 | 7.34 | 4.28 | 3.46 | 2.71 | 1.93 |

20

【0042】

注：粒子が凝集し測定不可

【0043】

第2表に示したように、リン酸ステロイドがナトリウム塩の場合には、全くナノ粒子内に封入されないのに対して、亜鉛あるいは第一鉄イオンの添加によって生じたリン酸ステロイドの沈殿 (BP-Zn, BP-Fe, DP-Zn, HP-Zn) を用いたことで、顕著にPLGAナノ粒子内への封入率が增加することが判明した。

また、第3表に示した結果から明らかなように、PLGAやリン酸ベタメサゾン量を一定としてその溶媒のアセトン量を変化させたところ、500μl以下ではナノ粒子が凝集してしましたが、700μlでは分散安定性が高く、リン酸ベタメサゾンが高濃度封入されたナノ粒子が調製され、それ以上のアセトン量では分散安定性は高いが、徐々に封入率が低くなることが明らかになった。

【0044】

実施例3：PLGA/PLAナノ粒子からのステロイドの放出挙動

リン酸ベタメサゾン5mgを100μlの水中に溶解し、0.5M酢酸亜鉛水溶液500μl中に添加した。12,000rpm/5分間で遠心し、上清を除去し亜鉛-ステロイドの沈殿を得た。この沈殿物中、分子量の異なる種々のPLGAあるいはPLA20mgを溶解したアセトンを500μl添加した。2時間室温で静置後、この溶液を1,400rpmで攪拌した0.5%Pluronic F68 (非イオン性高分子界面活性剤) あるいはレシチン懸濁液中に1ml/分の速度で27Gシリンジを通して添加した。得られたナノ粒子は、1~2時間室温で攪拌しながら放置後、EDTAを加えた後、限外濾過 (アミコン社製: central prep YM-10) で濃縮洗浄した。このナノ粒子をFBS (ウシ胎児血清) /PBS (v/v=1) 中にPLGA濃度として500μg/mLとなるように懸濁し、所定時間後1/2.5ボリュームの0.5MのEDTA水溶液 (pH8) を加え、20,000gで30分間遠心した。上清を除去した後、水を加えて再度遠心によりナノ粒子を洗浄した。得られたナノ粒子は、2N-NaOH水溶液中でPLGA/PLAを分解し、HPLCにてナノ粒子中のステロイド量を定量した。

なお、比較対照として、本発明者等が先に特願 (特願2002-159190) している方法により調製した疎水性ステロイドのBDP (ベタメサゾンジプロピオネート) を封入

50

したナノ粒子について同様定量した。

その結果を第4表に示した。

【 0 0 4 5 】

表4 ナノ粒子からのバタメサゾン放出挙動

【 0 0 4 6 】

【表4】

| PLGA/PLA | バタメサゾンの累積放出量(%) | | | | | | |
|----------------------------------|-----------------|----|----|----|----|-----|-----|
| | 5時間 | 1日 | 2日 | 4日 | 8日 | 11日 | 20日 |
| PLA* ¹ (Mw 14000) | 27 | 53 | 64 | 79 | 97 | 98 | 100 |
| PLGA* ² (Mw 8000) | 0 | 17 | 29 | 35 | 60 | 70 | 93 |
| PLGA* ² (Mw 18000) | 0 | 11 | 18 | 34 | 47 | 53 | 62 |
| PLA* ² (Mw 9000) | 0 | 12 | 13 | 25 | 28 | 30 | 38 |
| PLA* ² (Mw 14000) | 0 | 3 | 4 | 8 | 10 | 14 | 31 |

10

20

【 0 0 4 7 】

* 1 : 特願2002-159190に記載の方法で調整したナノ粒子

* 2 : 本発明方法により調製したナノ粒子

【 0 0 4 8 】

本発明者等が先に出願(特願2002-159190)している方法により調製した疎水性ステロイドのBDP(バタメサゾンジプロピオネート)を封入したナノ粒子からは、初期の段階でバタメサゾンが放出され、6日後にはほぼ9割以上のバタメサゾンがナノ粒子から放出されているのに対し、本発明方法により調製したナノ粒子にあっては、初期のバースト放出が著しく抑制されており、さらにその後も徐々にステロイドが放出されていることが判明した。

30

また、分子量が小さいPLGAあるいはPLAを用いて調製したナノ粒子の方が、早期にステロイドが放出されており、またPLAを用いて調製したナノ粒子よりもPLGAを用いて調製したナノ粒子の方がより早くステロイドが放出されていることが判明した。

【 0 0 4 9 】

実施例4: マクロファージに取り込まれたナノ粒子からのステロイドの放出挙動

10%プロテオスベプトンを1.5ml腹腔内投与して刺激したマウスの腹腔からマクロファージを採取し、 6×10^5 cells/12wellで播種し、マクロファージSFM培地(Gibco社製)により一晩培養した。培地を交換後、実施例3にしたがって調製したPLGANANO粒子またはPLANANO粒子を添加し、37℃にて2時間インキュベートした。細胞をPBSおよび培地で8回洗浄した後、所定時間ごとに培地中に含まれるバタメサゾン量をELISA法により定量した。

なお、比較対照として、本発明者等が先に出願(特願2002-159190)している方法により調製した疎水性ステロイドのBDP(バタメサゾンジプロピオネート)を封入したナノ粒子を添加し、同様検討した。

その結果を第5表に示した。

第5表: ナノ粒子を取り込んだマクロファージからのバタメサゾン放出挙動

【 0 0 5 0 】

40

【表 5】

| | ベタメサゾン集積放出量 (%) | | | | | | | |
|--------------|-----------------|-------|--------|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 2 時 間 | 4 時 間 | 10 時 間 | 1 日 | 2 日 | 3 日 | 5 日 | 7 日 |
| 対照ナノ粒子 = 1 | 26 | 42 | 68 | 86 | 96 | 97 | 98 | 99 |
| 本発明のナノ粒子 = 2 | 3 | 4 | 11 | 27 | 64 | 77 | 89 | 96 |

【 0 0 5 1 】

* 1 : P L A (M w 1 4 0 0 0) を用いてナノ粒子を調製 (特願 2 0 0 2 - 1 5 9 1 9 0)

10

* 2 : P L G A (M w 8 0 0 0) を用いてナノ粒子を調製

【 0 0 5 2 】

発明者等が先に出願 (特願 2 0 0 2 - 1 5 9 1 9 0) している方法により調製した疎水性ステロイドの B D P (ベタメサゾンジプロピオネート) を封入したナノ粒子からは、初期の段階でベタメサゾンが放出され、2 日後には殆どが放出されているのに対し、本発明方法により調製したナノ粒子の場合には、およそ 2 ~ 3 日後までは 0 次放出に近い挙動を示し、その後も緩やかに放出され続けることが判明した。

【 0 0 5 3 】

実施例 5 : ナノ粒子の分散安定性評価

実施例 3 に従い調製したアセトン溶液を、種々の界面活性剤を溶解した水中に滴下することによりナノ粒子を得た。また、得られたナノ粒子を、濃縮・洗浄・精製し、種々の濃度のショ糖溶液中で凍結乾燥した後、再度水を添加することでナノ粒子の再分散性を光散乱計により評価した。

20

【 0 0 5 4 】

レシチン、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコール類あるいはポリソルベート類の界面活性剤を含有する水溶液を用いて調製したナノ粒子は、いずれの場合にあっても、ほぼ同じ粒径を有するナノ粒子となり、また界面活性剤の濃度を 0. 0 1 ~ 1 % の範囲内で変化させた場合にあっても、ナノ粒子の粒径、分散安定性、リン酸ベタメサゾン封入率に大きな相違は認められなかった。

しかし、ポリビニルアルコール溶液に滴下して調製したナノ粒子では、他の界面活性剤で調製したナノ粒子に比べ粒径が大きくなり、また、リン酸ベタメサゾン封入率も低かった。また、ナノ粒子重量に対し 5 倍重量以上のショ糖を添加して凍結乾燥処理することにより、凍結乾燥後のナノ粒子の再分散性が維持されることが判明した。

30

【 0 0 5 5 】

実施例 6 : ナノ粒子の炎症部位への集積性

L e w i s 系雄性ラット左後股足底皮内に、1 % カラゲニン含有生理食塩水を 1 0 0 μ l 投与し、炎症を惹起させた。4 時間後に、ローダミンを封入した平均粒径が 2 0 0 n m あるいは 5 0 0 n m を有するナノ粒子を尾静脈より単回投与した。投与 2 時間後に足浮腫を切除し、クリオスタットにより凍結切片を作製し、その組織を蛍光顕微鏡により観察した。

40

なお、比較対照例として、生理食塩水のみを投与群ならびにローダミンのみを投与群をおいた。

【 0 0 5 6 】

平均粒径が 2 0 0 n m のナノ粒子を投与した群では、切片組織像の蛍光強度は、対照の生理食塩水のみを投与した群の切片組織像に比較して、著しく増大しており、ナノ粒子が炎症部位に集積していることが判明した。

また、ローダミンのみを投与した群、あるいは平均粒径が 5 0 0 n m のナノ粒子を投与した群では、炎症部位への集積性は認められなかった。

【 0 0 5 7 】

実施例 7 : アジュバント関節炎抑制作用

50

体重130～160gの7週齢Lewis系ラットを1週間の予備飼育後、エーテル麻酔下にて、6mg/mL M. Butyricum Desiccated (DIFCO社製) 含有アジュバンドIncomplete Freund (DIFCO社製) 溶液50μlを左後肢足蹠皮内に注射し、関節炎を惹起させた。M. Butyricum投与14日後、左後肢容積を指標に、各実験群間に隔たりがないように分けた一群のラットに、リン酸ベタメサゾンを含むPLAナノ粒子を単回静脈内投与した。

また、対照として、他の群のラットにリン酸ベタメサゾンあるいはリン酸緩衝生理食塩水(PBS)をそれぞれ単回皮下投与、もしくはリメタゾン(三菱ウェルファーマ社製)を単回静脈内投与した。

関節炎の炎症抑制作用は、薬物投与前、投与後7日間の左後肢容積を水置換法で測定することによって解析した。

得られた結果を第6表に示した。

【0058】

第6表：ナノ粒子によるアジュバント関節炎抑制作用

【0059】

【表6】

| 投 与 群 | 投与後(日)の炎症率*3(%) | | | | | | |
|------------------|-----------------|------|------|------|------|------|------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| 本発明のナノ粒子*1 | 69.0 | 68.7 | 68.3 | 69.0 | 70.3 | 70.8 | 71.3 |
| リメタゾン*2 | 66.9 | 72.0 | 79.2 | 78.5 | 80.0 | 79.0 | — |
| リン酸ベタメサゾン(300μg) | 68.3 | 76.5 | 79.2 | 81.7 | 88.0 | — | 84.8 |
| リン酸ベタメサゾン(100μg) | 78.4 | 80.0 | 82.8 | 85.4 | 84.2 | 83.0 | 81.7 |
| 生理食塩水 | 100.8 | 98.1 | 98.0 | 96.7 | 96.0 | 95.5 | 96.2 |

20

【0060】

*1：PLA(Mw14000)を使用して、リン酸ベタメサゾンを含むナノ粒子を調製した。リン酸ベタメサゾンとして100μgに相当する量を投与。

*2：リン酸デキサメサゾンに換算して100μgに相当する量を投与。

*3：炎症率は、以下の計算式による。

炎症率(%)=(測定した足容積-アジュバンド未投与の足容積)/(薬物投与前の足容積-アジュバンド未投与の足容積)×100

30

【0061】

第6表に示したように、すでに臨床的に使用されているステロイド性抗炎症剤であるリメタゾンの投与群では、投与後1日目には、3倍量のリン酸ベタメサゾンを含む場合と同程度の抗炎症作用を示した。また、その抗炎症作用は、リン酸ベタメサゾンのみを投与した場合と同様に、その後徐々に弱まっていった。これに対して本発明のリン酸ベタメサゾンを含むPLAナノ粒子の投与群では、投与後1日目でリメタゾンと同程度の強い抗炎症作用を示し、その後7日間にわたり強い抗炎症作用が持続されていた。

【0062】

実施例8：PGE₁を含むPLGA/PLAナノ粒子の調製

40

1mgのPGE₁を20μlのエタノールに溶解し、0.5M塩化第一(あるいは第二)鉄水溶液80μl中に添加した。12,000rpm/5分間の遠心を行い、上清を除去して鉄-PGE₁の沈殿を得た。この沈殿物中に、PLGA(和光純薬工業社製)あるいはPLA(和光純薬工業社製)を溶解したアセトン溶液を添加した。さらに酢酸亜鉛水溶液を添加し、2時間室温で静置後、この溶液(または懸濁液)を400rpmで攪拌した。0.5%Pluronic F68(非イオン性高分子界面活性剤)あるいはレシチン懸濁液中に1ml/分の速度で27Gシリンジを通して添加した。得られたナノ粒子は、1～2時間室温で攪拌しながら放置後、0.4倍量の0.5MのEDTA水溶液(pH8)を加え、20,000gで20分遠心した。上清を除去した後、水を加え再度遠心によりナノ粒子を洗浄した。得られたナノ粒子は、アセトニトリル中に溶解し、PBSで希釈し

50

、ELISA法によりPGE₁を定量した。

また、実施例4と同様にマクロファージにPGE₁封入PLGAナノ粒子を取り込ませ、所定時間ごとに培地中に含まれるPGE₁量をELISA法により定量した。

その結果を第7表に示した。

【0063】

第7表：ナノ粒子を取り込んだマクロファージからのPGE₁放出挙動

【0064】

【表7】

| | PGE ₁ 累積放出量 (%) | | | | | | | | |
|---|----------------------------|-----|------|----|----|----|----|----|-----|
| | 2時間 | 5時間 | 10時間 | 1日 | 2日 | 3日 | 4日 | 6日 | 8日 |
| PGE ₁ 封入 ナノ粒子 ^{*1} | 22 | 42 | 60 | 75 | 90 | 95 | 98 | 99 | 100 |

10

【0065】

*1：PLGA (Mw8,000)を用いてナノ粒子を調製

【0066】

PGE₁のPLGANano粒子中への封入率は、約0.1ないし1重量%程度であった。また、第7表に示した結果からも判明するように、ステロイド性抗炎症剤であるリン酸ベタメサゾンほどの徐放挙動を示さなかったものの、8日間にわたりPGE₁が放出されつづけていることが理解される。

20

【産業上の利用可能性】

【0067】

以上記載したように、本発明により、水溶性非ペプチド性低分子医薬品をPLGAまたはPLANano粒子内に十分量封入することができ、かつ、粒子からの当該医薬品の初期バースト現象を抑制し、長期間にわたり医薬品を徐放することが可能である静脈注射用のナノ粒子が提供される。

本発明により提供される静脈注射用のナノ粒子は、各種の炎症部位・血管病変部位・感染部位・悪性腫瘍組織にターゲティングし、その部位あるいは組織に効率よく集積する。次いで、その場で粒子中に封入された水溶性非ペプチド性低分子医薬品を、持続的に放出し、当該医薬品の生物活性を発揮することより、その医療上の有用性は多大なものである。

30

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/JP2004/003246

| | | |
|---|--|--|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 A61K9/51 | | |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC | | |
| B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 A61K | | |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched | | |
| Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, CHEM ABS Data, PAJ, WPI Data, MEDLINE, EMBASE, BIOSIS | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Referred to claim No. |
| X | ALLEMANN, ERIC ET AL: "PEG-coated poly (lactic acid) nanoparticles for the delivery of hexadecafluoro zinc phthalocyanine to EMT-6 mouse mammary tumors" JOURNAL OF PHARMACY AND PHARMACOLOGY (1995), 47(5), 382-7, 1995, XP009031737 abstract page 383, column 2, paragraph 2 page 387, column 1, paragraph 2 | 1-18 |
| A | US 6 143 211 A (CHICKERING III DONALD ET AL) 7 November 2000 (2000-11-07) the whole document | 1-18 |
| -/- | | |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex. | | |
| * Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step unless the document is taken into account "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents in the art. "Z" document member of the same patent family | | |
| Date of the actual completion of the international search 4 June 2004 | | Date of mailing of the international search report 14/06/2004 |
| Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 5818 Potlitzstrasse NL - 2200 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2940, Tel. 01 657 epo nl Fax: (+31-70) 340-2010 | | Authorized officer Hedegaard, A |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/JP2004/003246

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|--|-----------------------|
| A | WO 02/096396 A (HIGAKI MEGUMU ; KIMURA MICHIO (JP); IGARASHI RIE (JP); LTT INST CO) 5 December 2002 (2002-12-05) the whole document | 1-18 |
| A | EP 1 002 529 A (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES LTD) 24 May 2000 (2000-05-24) the whole document | 1-18 |
| A | US 5 989 463 A (BURKE PAUL A ET AL) 23 November 1999 (1999-11-23) the whole document | 1-18 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/JP2004/003246

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|--|------------------|-------------------------|------------------|
| US 6143211 A | 07-11-2000 | AU 718482 B2 | 13-04-2000 |
| | | AU 6505096 A | 18-02-1997 |
| | | CA 2227284 A1 | 06-02-1997 |
| | | EP 0844871 A1 | 03-06-1998 |
| | | JP 2001513071 T | 28-08-2001 |
| | | WO 9703657 A1 | 06-02-1997 |
| | | US 6235224 B1 | 22-05-2001 |
| | | US 2004070093 A1 | 15-04-2004 |
| | | US 2001042932 A1 | 22-11-2001 |
| | | AU 714584 B2 | 06-01-2000 |
| | | AU 6762396 A | 18-02-1997 |
| | | CA 2227287 A1 | 06-02-1997 |
| | | EP 0840623 A1 | 13-05-1998 |
| | | JP 11510142 T | 07-09-1999 |
| | | WO 9703702 A1 | 06-02-1997 |
| | | US 6677313 B1 | 13-01-2004 |
| WO 02096396 A | 05-12-2002 | JP 2002348234 A | 04-12-2002 |
| | | EP 1338025 A1 | 17-03-2004 |
| | | WO 02096396 A1 | 05-12-2002 |
| EP 1002529 A | 24-05-2000 | EP 1002529 A1 | 24-05-2000 |
| | | AT 197398 T | 11-11-2000 |
| | | AU 695323 B2 | 13-08-1998 |
| | | AU 3399095 A | 27-03-1996 |
| | | BR 9509201 A | 30-12-1997 |
| | | CA 2196184 A1 | 14-03-1996 |
| | | CN 1157562 A | 20-08-1997 |
| | | DE 69519382 D1 | 14-12-2000 |
| | | DE 69519382 T2 | 17-05-2001 |
| | | DK 779806 T3 | 27-11-2000 |
| | | EP 0779806 A1 | 25-06-1997 |
| | | ES 2151079 T3 | 16-12-2000 |
| | | FI 970952 A | 06-03-1997 |
| | | GR 3035171 T3 | 30-04-2001 |
| | | WO 9607399 A1 | 14-03-1996 |
| | | JP 8217691 A | 27-08-1996 |
| | | NZ 292263 A | 23-12-1998 |
| | | PT 779806 T | 28-02-2001 |
| | | RU 2181999 C2 | 10-05-2002 |
| | | US 2002168337 A1 | 14-11-2002 |
| | | US 6376461 B1 | 23-04-2002 |
| | | US 6087324 A | 11-07-2000 |
| | | US 2002058622 A1 | 16-05-2002 |
| | | NO 971030 A | 06-03-1997 |
| US 5989463 A | 23-11-1999 | AT 240718 T | 15-06-2003 |
| | | AU 746337 B2 | 18-04-2002 |
| | | AU 9400998 A | 12-04-1999 |
| | | CA 2304662 A1 | 01-04-1999 |
| | | DE 69814885 D1 | 26-06-2003 |
| | | DE 69814885 T2 | 19-05-2004 |
| | | DK 1017367 T3 | 22-09-2003 |
| | | EP 1017367 A1 | 12-07-2000 |
| | | ES 2200375 T3 | 01-03-2004 |
| | | JP 2001517615 T | 09-10-2001 |
| | | PT 1017367 T | 31-10-2003 |
| | | WO 9915154 A1 | 01-04-1999 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.
PCT/JP2004/003246

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| US 5989463 | A | US 6455074 B1 | 24-09-2002 |

フロントページの続き

(51) Int. Cl.

F I

テーマコード (参考)

| | | | | | |
|---------|--------|-----------|---------|--------|-------|
| A 6 1 K | 31/573 | (2006.01) | A 6 1 K | 31/573 | |
| A 6 1 P | 29/00 | (2006.01) | A 6 1 P | 29/00 | 1 0 1 |
| A 6 1 P | 35/00 | (2006.01) | A 6 1 P | 35/00 | |
| A 6 1 P | 31/00 | (2006.01) | A 6 1 P | 31/00 | |

(81) 指定国 AP (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AB, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

Fターム (参考) 4C086 AA01 AA02 DA10 MA02 MA05 MA38 MA41 MA66 NA12 NA13
 ZB11 ZB15 ZB26 ZB31